

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

31 October 2000 (31.10.00)

International application No.

PCT/EP00/02174

Applicant's or agent's file reference

000745woMegè

International filing date (day/month/year)

13 March 2000 (13.03.00)

Priority date (day/month/year)

12 March 1999 (12.03.99)

Applicant

MEYER-ALMES, Franz, Josef

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 September 2000 (21.09.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Juan Cruz

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 04 DEC 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 000745woMege	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02174	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 12/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/50		
Anmelder EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH et al		


- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 21/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Cuendet, P Tel. Nr. +49 89 2399 8690



THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-11 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02174

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1). **Präambel**

1.1. Der erste Teil von **Anspruch 1** wäre dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt gewesen; s. z.B. D1: Fulda et al., Klin.Pädiatr.201(4),1998,148-152; D2: Fulda et al. Cancer Research US, 57(17),1997,3823-3829 und D4: WO-A-98/13517 / Seite 8 der vorliegenden Beschreibung. Der zweite Teil von Anspruch 1, d.h. die Messung im Lysat, macht für den Fachmann eine Messung der kumulierten Aktivität verständlich und schliesst auch eine flowcytometrische Bestimmung aus; s. auch vorliegende Seite 8.

1.2. Die gegebene Situation "ohne vorherige Abtrennung der Zellen" ermöglicht eine einfachere/effizientere Testführung, s. vorliegende S.8, zweitletzter Abschnitt plus Übergangsabschnitt Seiten 8/9.

1.3. In den bekannten Verfahren die Flowcytometrie verwenden, werden scheinbar keine Kits mit Probenkammern mit der "Substanz" und der "standardisierten Lösung" gemäss **Anspruch 9** verwendet; vgl. z.B. D4, S.5. In D6: WO-A-99/09208 wird die Capsase-Aktivität in einem Teströhrchen durchgeführt (kein Träger mit Kammern); s. D6, Anspruch 11 und S.36, Punkt 5.

2). **Punkt V.2.**

2.1. Neuheit: ja

Der nächstliegende Stand der Technik sind Verfahren gemäss Anspruch 1 (erster Teil) in denen Flowcytometrie verwendet wird; s. D1, D2 und D4. Wie in den obigen Punkten 1.1. und 1.3. ersichtlich ist, scheinen die vorliegenden Ansprüche 1 (und 2-8), 9 (und 10-11) neu zu sein.

2.2. Erfinderische Tätigkeit: ja

Gemäss obigem Punkt 1.2. scheint das Verfahren der vorliegenden Erfindung erfinderisch zu sein. Durch seine Verwendung im Verfahren der vorliegenden Erfindung scheint der (neue) Kit gemäss der Ansprüche 9-11 ebenfalls erfinderisch zu sein.

2.3. D3: WO-A-99/18856 ist ein P-Dokument das mit der vorliegenden (als gültig angenommenen) Priorität nicht zum Stand der Technik gehört. Bemerkung: Im "Example 78" von D3 könnte ein Kit gemäss Anspruch 9 impliziert sein. Beim Eintritt in die regionale Phase, könnte dies, gemäss Art. 54(3)EPÜ, von Bedeutung sein.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3). **Punkt VI.**

s. oben in Punkt V.2.2.3.

4). **Punkt VIII.**

4.1. Aus Gründen der Klarheit müsste die "Substanz" im Kit-Anspruch 9 wie im Verfahren definiert werden; es ist die "zu testende Substanz" (s.S.14) "zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen" (s. Anspruch 1).

4.2. Auf S.8 müsste die zitierte Publikation von Fulda S. et al. vollständig angegeben werden; s. oben in Punkt 1.1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

09/762304

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

NOV 09 2001

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference 000745woMege	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/02174	International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N33/50		
Applicant EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 September 2000 (21.09.00)	Date of completion of this report 29 November 2000 (29.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/EP00/02174

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-8, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-11, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/6 - 6/6, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1). **Preamble**

1.1 The first part of **Claim 1** is known from the prior art to a person skilled in the art; see for example D1: Fulda et al., Klin. Pädiatr. 201(4), 1998, 148-152; D2: Fulda et al., Cancer Research US, 57(17), 1997, 3823-3829 and D4: WO-A-98/13517, page 8 of the present description. The second part of Claim 1, that is, the measurement in the lysate, clarifies a measurement of the cumulative activity for a person skilled in the art and also excludes a flow cytometric determination; see also present page 8.

1.2 The situation in question "without prior separation of the cells" makes it possible to conduct the test in a simpler and more efficient manner; see present page 8, penultimate section and the section bridging pages 8 and 9.

1.3 In the known methods that use flow cytometry, it appears that no kits are used that have sample chambers having the "substance" and the "standardized solution" according to **Claim 9**; cf. for example D4, page 5. In D6: WO-A-99/09208, the caspase activity is carried out in a test tube (not a carrier having chambers), see D6, Claim 11 and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

page 36, point 5.

2). **Box V.2**

2.1. Novelty: established

The closest prior art consists of methods according to Claim 1 (first part) in which flow cytometry is used; see D1, D2 and D4. As is clear from points 1.1 and 1.3 above, present Claims 1 (and 2-8) and 9 (and 10-11) appear to be novel.

2.2. Inventive step: established

According to point 1.2 above, the method of the present invention appears to be inventive. Based on its use in the method of the present invention, the (novel) kit according to Claims 9-11 likewise appears to be novel.

2.3. D3: WO-A-99/18856 is a P document which, having the present priority (accepted as valid), does not belong to the prior art. Note: "Example 78" from D3 could suggest a kit according to Claim 9. This could, pursuant to EPO Article 54(3), be significant upon entry into the regional phase.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/02174

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

See Box V.2, point 2.3 above.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

4.1 For reasons of clarity, the "substance" in kit Claim 9 should be defined as in the method; it is the "substance to be tested" (see page 14) "for determining the chemosensitivity of cells" (see Claim 1).

4.2 The citation on page 8 of the publication by Fulda S. et al. should be provided in complete form; see above in point 1.1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 000745woMege	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 02174	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/03/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 12/03/1999
Anmelder EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

CHEMOSENSITIVITÄTSMESSUNG ÜBER CASPASE-AKTIVITÄT

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/37 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>FULDA, S. ET AL.: "Molecular determinants of apoptosis induced by cytotoxic drugs"</p> <p>KLINISCHE PÄDIATRIE,</p> <p>Bd. 210, Nr. 4, Juli 1998 (1998-07),</p> <p>Seiten 148-152, XP000900914</p> <p>Seite 149, rechte Spalte, Zeile 22-24</p> <p>Seite 151, rechte Spalte, Zeile 17 - Zeile 23</p> <p>Seite 151, rechte Spalte, Zeile 28-30</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoekstra, S

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FULDA ET AL: "The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells" CANCER RESEARCH,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, Bd. 57, Nr. 17, 1. September 1997 (1997-09-01), Seiten 3823-3829, XP002118945 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	1-11
P,X	WO 99 18856 A (CYTOVIA INC) 22. April 1999 (1999-04-22) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 68,70	1-11
X	WO 98 13517 A (DEBATIN KLAUS MICHAEL ;DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE); RUPRECHT KARLS) 2. April 1998 (1998-04-02) Ansprüche 1,5-7	9-11
P,A	WO 99 24620 A (UNIV CALIFORNIA) 20. Mai 1999 (1999-05-20) Seite 9, Zeile 10	1-11
A	WO 99 09208 A (COULTER INT CORP) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Ansprüche 10,19 Spalte 1, Zeile 59 -Spalte 2, Zeile 8	1-11
A	COHEN G: "Caspase: the executioners of apoptosis" BIOCHEMICAL JOURNAL,GB,PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 326, 15. August 1997 (1997-08-15), Seiten 1-16, XP002091927 ISSN: 0264-6021 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
A	STENNICKE, H.R. AND SALVESENS, G.S.: "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7 and -8" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 41, 1997, Seiten 25719-25723, XP002146144 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02174

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9918856	A	22-04-1999	AU 1072299 A		03-05-1999
			EP 1026988 A		16-08-2000
			NO 20001322 A		13-06-2000
WO 9813517	A	02-04-1998	DE 19639450 A		09-04-1998
			EP 0934430 A		11-08-1999
WO 9924620	A	20-05-1999	AU 1393399 A		31-05-1999
			EP 1030934 A		30-08-2000
WO 9909208	A	25-02-1999	US 5976822 A		02-11-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/EP 00/02174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/37 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>✓ FULDA, S. ET AL.: "Molecular determinants of apoptosis induced by cytotoxic drugs" KLINISCHE PÄDIATRIE, vol. 210, no. 4, July 1998 (1998-07), pages 148-152, XP000900914 page 149, right-hand column, line 22-24 page 151, right-hand column, line 17 - line 23 page 151, right-hand column, line 28-30</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 2000

Date of mailing of the international search report

18/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter onal Application No

PCT/EP 00/02174

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	✓ FULDA ET AL: "The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells" CANCER RESEARCH, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 57, no. 17, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 3823-3829, XP002118945 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-11
P, X	✓ WO 99 18856 A (CYTOVIA INC) 22 April 1999 (1999-04-22) cited in the application claims 68, 70	1-11
X	✓ WO 98 13517 A (DEBATIN KLAUS MICHAEL ; DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE); RUPRECHT KARLS) 2 April 1998 (1998-04-02) claims 1, 5-7	9-11
P, A	✓ WO 99 24620 A (UNIV CALIFORNIA) 20 May 1999 (1999-05-20) page 9, line 10	1-11
A	✓ WO 99 09208 A (COULTER INT CORP) 25 February 1999 (1999-02-25) claims 10, 19 column 1, line 59 - column 2, line 8	1-11
A	✓ COHEN G: "Caspase: the executioners of apoptosis" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 326, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 1-16, XP002091927 ISSN: 0264-6021 cited in the application the whole document	1-11
A	✓ STENNICKE, H.R. AND SALVESENS, G.S.: "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7 and -8" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 41, 1997, pages 25719-25723, XP002146144 cited in the application the whole document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02174

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918856	A	22-04-1999	AU 1072299 A EP 1026988 A NO 20001322 A	03-05-1999 16-08-2000 13-06-2000
WO 9813517	A	02-04-1998	DE 19639450 A EP 0934430 A	09-04-1998 11-08-1999
WO 9924620	A	20-05-1999	AU 1393399 A EP 1030934 A	31-05-1999 30-08-2000
WO 9909208	A	25-02-1999	US 5976822 A	02-11-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. September 2000 (14.09.2000)

PCT

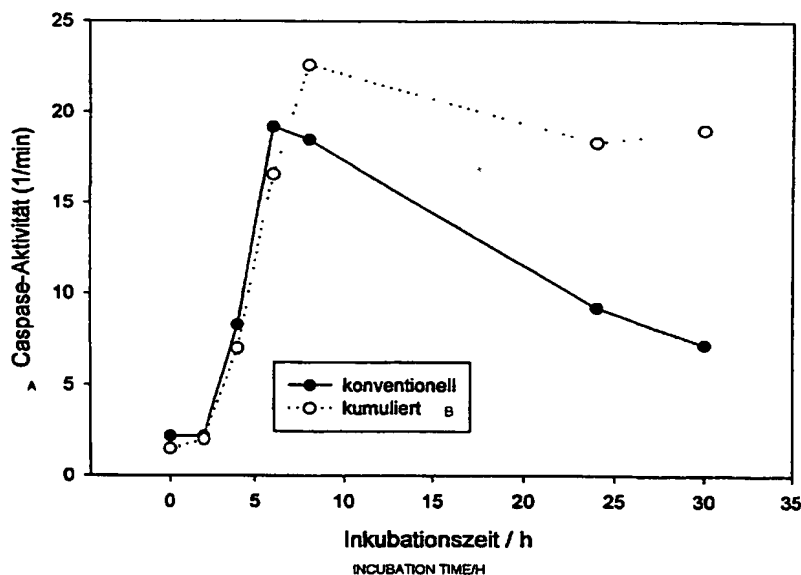
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/54049 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/37, G01N 33/574 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH [DE/DE]; Max-Planck-Str. 15 a, D-40699 Erkrath (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02174 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEYER-ALMES, Franz, Josef [DE/DE]; Dürerstr. 39, D-58636 Iserlohn (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 13. März 2000 (13.03.2000) (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität:
199 10 956.7 12. März 1999 (12.03.1999) DE
99108495.5 30. April 1999 (30.04.1999) EP

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DETERMINATION OF THE CHEMOSENSITIVITY VIA THE CASPASE ACTIVITY

(54) Bezeichnung: CHEMOSENSITIVITÄTSMESSUNG ÜBER CASPASE-AKTIVITÄT



A... CASPASE ACTIVITY (1/MIN)
B... CONVENTIONAL ACCUMULATED

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the chemosensitivity of cells vis-à-vis at least one substance by measuring the level of apoptosis triggered by the at least one substance. According to the inventive method, apoptosis is determined on the basis of the accumulated caspase activity in a sample with cells and a medium by mixing the sample with the at least one substance and incubating it. The accumulated caspase activity in the cells is measured after destruction of the cells without removing the cells beforehand.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/54049 A3



Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

14. Dezember 2000

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität in einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen ohne vorherige Abtrennung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/EP 00/02174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/37 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FULDA, S. ET AL.: "Molecular determinants of apoptosis induced by cytotoxic drugs" KLINISCHE PÄDIATRIE, vol. 210, no. 4, July 1998 (1998-07), pages 148-152, XP000900914</p> <p>page 149, right-hand column, line 22-24</p> <p>page 151, right-hand column, line 17 - line 23</p> <p>page 151, right-hand column, line 28-30</p> <p style="text-align: center;">— -/- —</p>	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 2000

Date of mailing of the international search report

18/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02174

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FULDA ET AL: "The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells" CANCER RESEARCH, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 57, no. 17, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 3823-3829, XP002118945 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-11
P,X	WO 99 18856 A (CYTOVIA INC) 22 April 1999 (1999-04-22) cited in the application claims 68,70	1-11
X	WO 98 13517 A (DEBATIN KLAUS MICHAEL ;DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE); RUPRECHT KARLS) 2 April 1998 (1998-04-02) claims 1,5-7	9-11
P,A	WO 99 24620 A (UNIV CALIFORNIA) 20 May 1999 (1999-05-20) page 9, line 10	1-11
A	WO 99 09208 A (COULTER INT CORP) 25 February 1999 (1999-02-25) claims 10,19 column 1, line 59 -column 2, line 8	1-11
A	COHEN G: "Caspase: the executioners of apoptosis" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 326, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 1-16, XP002091927 ISSN: 0264-6021 cited in the application the whole document	1-11
A	STENNICKE, H.R. AND SALVESSENS, G.S.: "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7 and -8" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 41, 1997, pages 25719-25723, XP002146144 cited in the application the whole document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

nal Application No

PCT/EP 00/02174

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9918856	A	22-04-1999	AU 1072299 A		03-05-1999
			EP 1026988 A		16-08-2000
			NO 20001322 A		13-06-2000
WO 9813517	A	02-04-1998	DE 19639450 A		09-04-1998
			EP 0934430 A		11-08-1999
WO 9924620	A	20-05-1999	AU 1393399 A		31-05-1999
			EP 1030934 A		30-08-2000
WO 9909208	A	25-02-1999	US 5976822 A		02-11-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02174

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/37 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N C12Q

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FULDA, S. ET AL.: "Molecular determinants of apoptosis induced by cytotoxic drugs" KLINISCHE PÄDIATRIE, Bd. 210, Nr. 4, Juli 1998 (1998-07), Seiten 148-152, XP000900914 Seite 149, rechte Spalte, Zeile 22-24 Seite 151, rechte Spalte, Zeile 17 - Zeile 23 Seite 151, rechte Spalte, Zeile 28-30 — -/-	1-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. September 2000

Absenddatum des internationalen Researchenberichts

18/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Researchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoekstra, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FULDA ET AL: "The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells" CANCER RESEARCH,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, Bd. 57, Nr. 17, 1. September 1997 (1997-09-01), Seiten 3823-3829, XP002118945 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	1-11
P,X	WO 99 18856 A (CYTOVIA INC) 22. April 1999 (1999-04-22) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 68,70	1-11
X	WO 98 13517 A (DEBATIN KLAUS MICHAEL ;DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE); RUPRECHT KARLS) 2. April 1998 (1998-04-02) Ansprüche 1,5-7	9-11
P,A	WO 99 24620 A (UNIV CALIFORNIA) 20. Mai 1999 (1999-05-20) Seite 9, Zeile 10	1-11
A	WO 99 09208 A (COULTER INT CORP) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Ansprüche 10,19 Spalte 1, Zeile 59 -Spalte 2, Zeile 8	1-11
A	COHEN G: "Caspase: the executioners of apoptosis" BIOCHEMICAL JOURNAL,GB,PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 326, 15. August 1997 (1997-08-15), Seiten 1-16, XP002091927 ISSN: 0264-6021 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
A	STENNICKE, H.R. AND SALVESSENS, G.S.: "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7 and -8" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 41, 1997, Seiten 25719-25723, XP002146144 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung... für selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02174

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9918856	A	22-04-1999	AU	1072299 A	03-05-1999
			EP	1026988 A	16-08-2000
			NO	20001322 A	13-06-2000
WO 9813517	A	02-04-1998	DE	19639450 A	09-04-1998
			EP	0934430 A	11-08-1999
WO 9924620	A	20-05-1999	AU	1393399 A	31-05-1999
			EP	1030934 A	30-08-2000
WO 9909208	A	25-02-1999	US	5976822 A	02-11-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/50		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/54049
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02174		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. März 2000 (13.03.00)			
(30) Prioritätsdaten: 199 10 956.7 12. März 1999 (12.03.99) DE 99108495.5 30. April 1999 (30.04.99) EP		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH [DE/DE]; Max-Planck-Str. 15 a, D-40699 Erkrath (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEYER-ALMES, Franz, Josef [DE/DE]; Dürerstr. 39, D-58636 Iserlohn (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

(54) Title: DETERMINATION OF THE CHEMOSENSITIVITY VIA THE CASPASE ACTIVITY

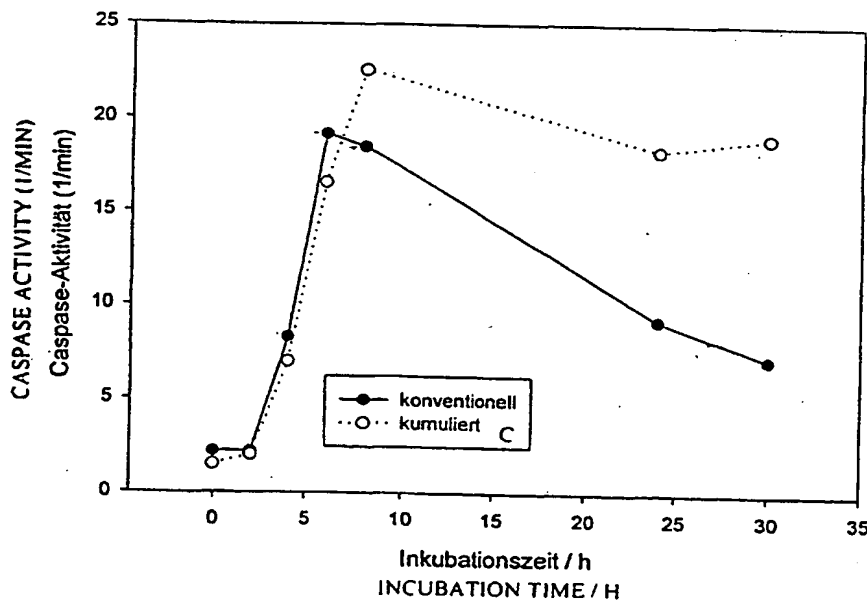
(54) Bezeichnung: CHEMOSENSITIVITÄTSMESSUNG ÜBER CASPASE-AKTIVITÄT

(57) Abstract

The invention relates to a method for determining the chemosensitivity of cells vis-à-vis at least one substance by measuring the level of apoptosis triggered by the at least one substance. According to the inventive method, apoptosis is determined on the basis of the accumulated caspase activity in a sample with cells and a medium by mixing the sample with the at least one substance and incubating it. The accumulated caspase activity in the cells is measured after destruction of the cells without removing the cells beforehand.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität in einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen ohne vorherige Abtrennung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird.



C...CONVENTIONAL
ACCUMULATED

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Chemosensitivitätsmessung über Caspase-Aktivität

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegenüber mindestens einer Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose.

Chemosensitivitätstests

Die Behandlungs- und Heilungserfolge von Tumorerkrankungen haben seit der Einführung der Chemotherapie stark zugenommen. Beispielsweise lag die Überlebensrate bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie (ALL) Mitte der 60er Jahre bei weniger als 10%. Heutzutage liegt die Heilungschance bei über 70%. Die Medikamente, sog. Zytostatika, werden nach bestimmten Therapieplänen allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht. Mittlerweile gibt es eine unüberschaubare Anzahl verschiedener Therapiepläne, die empirisch ermittelt und ständig weiterentwickelt werden. Das Hauptkriterium für einen verbesserten Therapieplan ist eine bessere Überlebensrate (clinical outcome). Dieses Kriterium trifft für die Mehrheit der Patienten zu. Jedes Individuum besitzt aber eine unterschiedliche Ausstattung an Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dies trifft insbesondere auf die

Eigenschaften von Tumorzellen zu. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie für eine Subpopulation extrem gut wirkt, während sie für andere Patienten aufgrund von medikamentresistenten Tumoren wenig oder überhaupt nicht wirksam ist. (Lacombe et al., Blood, 84, 716-723 (1994), Smit et al. International Journal of Cancer 51, 72-78 (1992)). Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Wirksamkeit verschiedener Medikamente, sondern auch die wirksame Dosis eines Medikamentes individuell unterschiedlich sein kann. Die Ermittlung der individuellen Dosierung eines Medikamentes ist für den Patienten von Bedeutung, damit er einerseits soviel an Medikamenten bekommt, wie für seine Heilung notwendig ist, und damit andererseits die toxischen Auswirkungen der Therapie und die Wahrscheinlichkeit einer durch die Chemotherapie induzierten sekundären Krebserkrankung so gering wie möglich gehalten wird. So gut die aktuell gebräuchlichen Therapiepläne auch sind, die Fortschritte der letzten Jahre stagnieren hinsichtlich der mittleren Überlebensrate. Eine weitere deutliche Verbesserung der Chemotherapie sollte durch die Erstellung individuell angepasster Therapiepläne möglich sein.

Um diese Problematik anzugehen haben einige Forscher versucht, die individuelle Sensitivität von Patiententumoren gegenüber Zytostatika *in vitro* zu messen. Die meisten Chemosensitivitätstests, die gegenwärtig verwendet werden, basieren wenigstens teilweise auf dem von Salmon (Salmon et al. Science, 197, 461-463 (1977)) entwickelten Agar-Tumorkultur-Test. Diese Tests messen die Zellproliferation.

Ein zweiter Typ von Chemosensitivitätstests umfasst den Ausschluss von (Fluoreszenz)-Farbstoffen oder die Freisetzung des radioaktiven Chromisotops ^{51}Cr , mit dem die Zerstörung der Zellmembran durch direkte oder indirekte Zytostatikawirkung gemessen wird. Eine Modifikation des früheren Farbstoffausschluss-Tests ist der sogenannte

DiSC-Assay (Weisenthal, Kern Oncology 5: 92-103 (1991)), der durch einen zweiten Färbvorgang zusätzlich zwischen normalen und Tumorzellen differenziert.

Der dritte Typ von Chemosensitivitätstests bestimmt Parameter des zellulären Metabolismus als Maß für die Schädigung durch Zytostatika. Dieser Testtyp umfasst den radiometrischen BACTEC-Test (von Hoff D., Forseth B., Warfel L., in Salmon Trent(Eds.) Human tumor cloning, pp. 656-657, Grune & Stratton, Orlando (1984)) , den MTT-Test (Freund A. et al. European Journal of Cancer 34:895-901 (1998), Kaspers G.J.L. Blood 92:259-266 (1998), Pieters R. et al. Leukemia 12, 1344-1348 (1998), Klumper E. et al. British Journal of Haematology 93:903-910 (1996), Hwang W.S. et al. Leukemia Research 17:685-688 (1993)) und seinen Variationen, den ATP-Test (Kangas L., Gronroos M., Nieminen A., Medical Biology 62: 338-343 (1984)) und den sogenannten FCA-Test (Meitner P., Oncology 5: 75-81, (1991), Rotman B, Teplitz C., Dickinson K., Cozzolino J., Cellular and Developmental Biology 24: f1137-1146 (1988)).

Agar-Kultur-Assays haben den großen Nachteil, dass bei weitem nicht alle Tumorzellen in den Agar-Kulturen wachsen. Dies gilt insbesondere für lymphatische Leukämien und Lymphome (Veerman A.J.P., Pieters R. British Journal of Haematology 74:381-384 (1990)). Beim bekanntesten Vertreter dieses Assay-Typs, dem Clonogenen Assay, liegt der Prozentsatz von auswertbaren Zellpopulationen nur bei 30-40%. Die Zellen müssen sehr lange (10-20 Tage) wachsen, bevor die Auswertung erfolgt. Außerdem ist der Arbeitsaufwand immens.

Die Farbstoff-Ausschluss-Tests wie auch der ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmen den Anteil von Zellen mit defekter Zellmembran. Diese Tests

beinhalten häufig eine Fixierung und anschließende mikroskopische Auswertung der Zellen bzw. die Messung der Radioaktivität im Überstand. Solche Tests sind aufgrund der Messung eines recht groben Parameters, der Zellmembranintegrität, unspezifisch und können nicht zwischen einer spezifischen Anti-Tumor-Wirkung einer Substanz oder einer physikalischen oder z.B. durch eine starke Verätzung oder Oxidation verursachten Zellschädigung durch eine Substanz unterscheiden. Tests dieses Typs sind folglich auch bei Substanzen positiv, die generell alle Zellen schädigen und damit nicht als Antitumor-Medikament geeignet sind. Der wohl aussagekräftigste Test des Farbstoff-Ausschluss-Typs ist der DiSC-Test. Durch zweifache Anfärbung kann er im Gegensatz zu anderen Farbstoff-Ausschlusstests zwischen der Zellschädigung von Tumorzellen und normalen Zellen unterscheiden. Die Zweifach-Färbung und die anschließende mikroskopische Auswertung sind aber extrem zeitaufwendig. Außerdem variieren die Ergebnisse abhängig von der Person, die die Auswertung durchführt, und dem Bildausschnitt, der unter dem Mikroskop untersucht wird.

Für den radiometrische Tests wie z.B. den ^{51}Cr -Freisetzungstest gelten ganz generell: Der Einsatz von radioaktiven Isotopen in diagnostischen Tests wird heutzutage wegen des Gefährdungspotentials und der Entsorgungsproblematik zunehmend vermieden. Hinzu kommt, dass inzwischen Fluoreszenz- und Luminiszenztechniken gleiche Sensitivitäten erreichen können bei häufig kürzerer Gesamttestdauer.

Von den Chemosensitivitäts-Tests, die den Metabolismus einer Zelle als Maß für die Proliferation verwenden, wird am häufigsten der MTT-Test und seine Variationen verwendet. Der MTT-Test hat nach einer 4-tägigen Inkubation der Zellen mit diversen Zytostatika eine relativ kurze Testdauer von etwa 4 Stunden. Außerdem können 96 Proben parallel in

einer Mikrotiterplatte mittels eines ELISA-Auslesegerätes ausgewertet werden. Dadurch wird ein passabler Durchsatz bei relativ geringem Personalaufwand gewährleistet. Der MTT-Test basiert auf der Umsetzung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in ein blaues Formazan-Produkt. Die Umsetzung wird durch Dehydrogenasen katalysiert, die nur in lebenden Zellen aktiv sind. Der MTT-Test ist abhängig von einer konstitutiven Basisaktivität der untersuchten Zellen. Es hat sich aber herausgestellt, dass einige Zelltypen, z.B. besonders häufig einige FAB-Subtypen von akuter myeloischer Leukämie, eine stark verringerte Dehydrogenaseaktivität besitzen (Santini V. et al. Hematological Oncology 7:287-293 (1989)). Die Chemosensitivität dieser Tumorzellen kann daher nicht mit einem MTT-Test bewertet werden. Ein weiteres Problem sind die entstehenden wasserunlöslichen Formazankristalle. Diese müssen durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln z.B. Dimethylsulfoxid oder Isopropanol in Lösung gebracht werden. Die Erfahrung hat gezeigt, dass dadurch Probleme bei der Reproduzierbarkeit des Tests auftreten.

Apoptose

Durch Arbeiten diverser Forschergruppen (z.B. Sen, S. et al. FEBS Lett. 307:122-127, Darzynkiewicz et al. Cytometry 13: 795-808 (1992), Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K.M. Int. J. Cancer 76:105-114 (1998)) erscheint es wahrscheinlich, dass durch Zytostatika verursachter Zelltod generell über den Mechanismus der Apoptose verläuft. Die Apoptose stellt einen von der Zelle selbst programmierten Zelltod dar, der durch physiologische Faktoren im Organismus induziert werden kann oder durch Chemikalien wie Zytostatika ausgelöst werden kann. Der programmierte Zelltod spielt eine außerordentlich große Rolle bei der Zytostase z.B. des Immunsystems. So werden beispielsweise T-

Zellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, durch die Apoptose aus dem Organismus entfernt. Ansonsten kann es zu Symptomen einer Autoimmunerkrankung kommen, z.B. Lupus Erythematodes, arthritische Erkrankungen oder der Erkrankung durch einen T-Zell Tumor. Substanzen wie der von Makrophagen synthetisierte Tumornekrosefaktor alpha sind natürliche Induktoren der Apoptose.

Apoptose verläuft nach einem programmierten, einheitlichen Schema, bei dem u.a. bestimmte cysteinhaltige Proteasen (Caspasen) aktiviert werden (Cohen G.M. Biochem. J. 326:1-16 (1997)). Die Aktivierung von Caspasen geschieht ausschließlich durch Apoptose und ist daher ein spezifischer Parameter für die Quantifizierung von Apoptose. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Zellmembranen noch intakt und undurchlässig für DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Propidiumiodid. Daher ist die Caspaseaktivität ein Parameter für die Wirkung von Zytostatika, der deutlich früher auftritt, als die Stunden später erfolgende Auflösung der Zellmembran.

Neben dem Zelltod durch Apoptose existiert eine andere Form von Zelltod, die z.B. physikalisch, durch osmotischen Schock, Verätzung oder Oxidation ausgelöste Nekrose. Diese äußert sich durch stark degenerative Schäden an der Zelle.

Medenica (US 5736129) bestimmt das Ausmaß der Zellschädigung durch Zytostatika, indem er die Zellen mit Propidiumiodid anfärbt und anschließend die angefärbten Zellen im FACS (fluorescence activated cell sorter) auszählt. Dieser Ansatz hat aber den großen Nachteil, nicht genau zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, und kann demzufolge den spezifischen Wirkmechanismus von Zytostatika nicht

erfassen. Außerdem ist der Zellbedarf für eine aussagekräftige Analyse sehr hoch.

Caspase-Aktivitätstests sind zur spezifischen Detektion von Apoptose bestens geeignet, weil nekrotische Schädigungen, die für zytostatische Wirkungen nicht aussagekräftig sind, nicht erfaßt werden (siehe Tabelle 1). Die in den letzten Jahren verwandten Methoden zur Caspaseaktivitätsmessung umfassen die gelelektrophoretische Auftrennung von spezifischen Proteinsubstraten, sowie chromogene und fluorogene Tests, bei denen durch die Caspasen farbige Produkte gebildet werden (s. z.B. Cohen G.M. Biochem. J. 326:1-16 (1997), Stennicke H.R., Salvesen G.S. J. Biol. Chem. 41:25719-25723 (1997)). Diese Tests sind alle dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Induktion zunächst sedimentiert und mit Puffer gewaschen werden und anschließend durch einen Lysepuffer zerstört werden, damit die Caspasen, die sich bis dahin im Zellinnern befunden haben, das zugegebene Substrat umsetzen können.

So beschreibt ein Katalog der Firma Clontech, Palo Alto, California, Katalog 98/99, Seiten 71 - 72 (1998) ein Verfahren zur Bestimmung der Apoptose von Zellen als Antwort auf die Einwirkung von Substanzen. Auch in dieser Versuchsanordnung wird gemäß den einschlägigen Arbeitsvorschriften Waschschriffe durchgeführt.

WO-A-99/18856 betrifft ein Verfahren zur Chemosensitivitätsmessung von Zellen gegen Substanzen, wobei zellgängige fluorogene Substrate eingesetzt werden. Nachteilig daran ist, dass nur spezielle Substrate eingesetzt werden können.

Fulda, S. et.al. offenbart eine Methode zur Messung von Apoptose induzierendem Doxorubizin, Cisplatin und VP-16 mittels Durchflussscytometrie. Damit sind keine Zelllysate messbar. Außerdem ist die Durchflussscytometrie eine vergleichsweise aufwendige Methode.

WO-A-98/13517 betrifft eine Methode zur Abschätzung des Ausmaßes der Apoptose in Zellen. Dabei werden die Zellen mit einem Substrat für Proteasen der ICE/Ced-3-Familie beladen und die Umsetzung des Substrates durch die Protease mittels Durchflussscytometrie verfolgt. Damit sind jedoch keine Lysate messbar. Wie angeführt, ist die Durchflussscytometrie verhältnismäßig aufwendig. Die Beladung der Zellen setzt darüber hinaus eine Permeabilisierung der Zellen voraus. Dies kann zu Komplikationen führen. Die Zellen sind durch die Permeabilisierungsbehandlung oft nicht hinreichend authentisch, sondern entsprechen eher einem artifiziellen System.

Aus dem Waschvorgang ergibt sich aber hinsichtlich einer einfachen, schnellen Testdurchführung mit geringem Zellmaterialbedarf folgendes Problem:

Die Apoptose und damit die Entwicklung der Caspaseaktivität ist ein dynamischer Prozess, bei dem die Zelle nach einer gewissen Zeit in die sogenannte sekundäre Nekrose übergeht. Beim Waschvorgang werden daher die Caspasen dieser zerstörten Zellen entfernt.

Dadurch erhält man ein Signal für aktuell in Apoptose befindliche Zellen, deren Zahl irgendwann durch sekundäre Nekrose abnimmt. Es ist bekannt, dass das Maximum der Zahl apoptotischer Zellen sowohl vom untersuchten Zytostatikum, als auch vom Zelltyp abhängt. A priori ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt die Caspase-Aktivität und damit das Ausmaß der Apoptose gemessen werden muss. Daraus folgt, dass

im Prinzip für jeden Patienten mehrere Proben mit z.B. Tumorzellen unterschiedlichen Inkubationszeiten hinsichtlich der Chemosensitivität bestimmt werden müssen. Der Bedarf an primären Patientenzellen wäre dann derartig hoch, dass nur noch die Chemosensitivität eines oder weniger Zytostatika getestet werden könnte. Außerdem wäre der Zeit- und Personalaufwand für die Chemosensitivitätstestung eines einzelnen Patienten extrem hoch.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die genannten Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen ohne vorherige Abtrennung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt insbesondere die Verwendung von schwer- oder nichtzellgängigen Substraten.

Wesentlich ist die Messung der kumulierten Caspaseaktivität. Bei diesem Ansatz werden Zellen, z.B. Tumorzellen eines Patienten, mit mindestens einer Substanz (z.B. Zytostatika) einen längeren Zeitraum inkubiert, so dass alle, auch die langsam wirkenden, wirksamen Pharmaka Zeit genug hatten, Apoptose auszulösen. Anschließend wird beispielsweise ein in einem Lysepuffer befindliches Substrat zugegeben und nach erfolgter Zell-Lyse die gesamte entstandene - kumulierte - Caspaseaktivität der Zellsuspension gemessen. Es wurde gefunden, dass durch Zytostatika aktivierte Caspasen auch nach sekundärer Nekrose apoptotischer Zellen aktiv bleiben, die kumulierte

Caspaseaktivität mit der Inkubationszeit steigt und ab dem Zeitpunkt, wo zunehmend sekundäre Nekrose stattfindet, auf einem hohen Level bleibt. Die herkömmlich (mit Waschschrift) bestimmte Caspaseaktivität steigt im Gleichschritt mit der kumulierten Caspaseaktivität, nimmt aber mit beginnender sekundärer Nekrose ab (siehe Figur 1). Das Prinzip der Messung der kumulierten Caspaseaktivität ermöglicht es somit, durch eine einzige Caspaseaktivitätsmessung die Wirkung von Substanzen auf die Zellen zu bestimmen. Dieser Test hat einen geringen Zellbedarf und kann in kurzer Zeit als Routinetest von Laboranten oder technischen Mitarbeitern durchgeführt werden. Durch die leichte Automatisierbarkeit ist der Personalaufwand für die Durchführung des Tests gering. Da der Test auf überall vorhandenen ELISA-Auslesegeräten durchgeführt werden kann, sind keine Geräteinvestitionen erforderlich. Um den Materialverbrauch weiter zu senken, ist eine Miniaturisierung möglich. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen in weniger als 10 µl Medium einige Tage in Kultur gehalten werden können. Durch die Senkung der Zellzahl pro Probenkammer auf 100 bis 1000 pro Test werden hochparallele Analysen von Proben mit äußerst wenig Patientenzellen, wie z.B. aus Feinnadelbiopsien, ermöglicht. Der geringe Zellbedarf ermöglicht auch die Hochdurchsatztestung (High Throughput Screening /HTS) von unbekannten Substanzen auf anti-Tumorstoffwirkung.

Wenn die Chemosensitivität von Zellen pathologischer Gewebe über Caspaseaktivität getestet wird, ist es von Vorteil, als Referenz gesunde Zellen des Gewebes sowie dieselben Zellen ohne Substanzzusatz mitzutesten. Insbesondere ist es sinnvoll als Kontrolle eine permanente Zell-Linie, deren Chemosensitivität bekannt ist, mitzutesten, um die Funktionalität des Tests zu dokumentieren und Fehler bei der Testdurchführung zu erkennen.

Als Substanzen kommen z.B. folgende Substanzen in Frage:

A) Zytostatika

Abrin, Amethopterin, Acivin, Aclacinomycin A, Alanin-Mustard, Altretamin, Aminoglutethimid, Aminopterin, Amsacrin (mAMSA), div. anabolische Steroide, Anthrapyrazol, L-Asparaginase, 5-Axacytidin, Bazillus Calmette-Guerin, Bisantren, Buserelin, Busulfan, Butyryloxyethylglyoxal-dithiosemicarbazone, Camptothecin, Carbamate-ester, Carzinophyllin, CCNU, Chlorambucil, Chlorethylmethylcyclohexyl-nitrosoharnstoff, Chlorethylcyclohexylnitrosoharnstoff, Chlorodeoxyadenosin, Corticotropin, Cyproteronacetat, Chlorotrianisen, Chlorozotozin, Chromomycin-A, Cytosinarabinosid (Ara-C), BCNU, Bleomycin, Cis-Platin, Carbo-Platin, Cladribine, Cyclophosphamid, Dactinomycin, Daunomycin, Daunorubicin, Decarbacin, Doxorubicin, DTIC, Dehydroemitin, 4-Demethoxydaunorubicin, Demothodoxorubicin, Deoxydoxorubicin, Dexamethason, Dibromodulcitol, Dichloromethotrexat, Diethylstilbestrol, Bis-(2-chloropropyl)-DL-Serin, Doxifluridin, Elliptiniumacetat, 4'-Epidoxorubicin, Epirubicin, Epoetin alpha, Erythropoeitin, Esorubicin, Estradiol, Etoposid, Fluoxymesteron, Flutamid, Folsäure, Fotemustin, Ftorafur, 4-FU, Fludarabine-Phosphat, 5-FU, Floxuridin, Galactitol, Galliumnitrat, Goserelin, G-CSF, GM-CSF, Hydrea, Hexamethylmelamin (HMM), Hydrocortison, Hydroxyprogesteron, 4-Hydroperoxycyclophosphamid, ICRf 159, Idamycin, Ifosfamid, Immunglobulin IGIV, Interferon, Kobalt-Proporphyrinkomplex, Leucovorin Calcium, Leuprolid, Levadopa, Levothyroxin, Lindan, Liothyronin, Liotrix, Lomustin, Levamisole, Masoprocol, Maytansin, Menogaril, 6-Mercaptopurin, Methosalen, Methylesteron, Methyl-lomustin, Mithracin, Mithramycin, Mitotan, Mitoxantron, Methotrexat (MTX), 6 MP, Mechlorethamin-Hydrochlorid, Medroxyprogesteron, Megestrolacetat, Melphalan, Mesna, Mitomycin-C, Nandrolon, Natriumphosphat P32,

Navelbin, Neocarzinostatin, Nitrofururazon, nHuIFNa, nHuIFNb, nHuIFNp, Octreotidacetat, Ondansetrone Hydrochlorid, Dinatrium-Pamidronat, Pentamethylmelamin (PMM), Pentostatin, Peptiochemio, Plicamycin, Prednimustin, Probroman, Procarbazin, Profiromycin, Paraplatin, Prednisolon, Prednison, RazoxanrIFNa-2a, Rubidazon, rIFNa-2b, rIFNb-1b, rIFNt-1b, rIL-2, rTNF, Semustin, SPG 827 (Podophyllinderivat), Spirogermanium, Streptonigrin, Somatostatin, Streptozocin, Tamoxifen, Taxol, Thio-TEPA, 6-Thioguanin, Tenoposid, Testolacton, Testosteron, 3-TGDR, rTNF, Thyroglobulin, Thyrotropin, Trilostan, Uracil-Mustard, VP-16, Vincristin (VCR), Vinblastin (VBL), Verapamil, Vindesin, Vinzelidin, Vitamin A-Säure, Vitamin A-Analoga, Zinostatin.

B) Peptide und Peptoide

C) Nukleinsäuren und -Derivate

D) Peptidnukleinsäuren (PNA's)

E) Hybride aus RNA's, DNA's, PNA's u. Derivate

Die Caspase-Aktivität kann sowohl durch Substratumsatz von fluorogenen oder chromogenen Substraten oder durch Bindung von spezifischen Markern z.B. Antikörper, F_{ab}-Fragmente, single chain Antikörper, Aptamere (Strukturen bindende Nukleinsäuren) und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für entweder unveränderte (Edukte) oder umgesetzte Caspase-Substrate (Produkte) gemessen werden. Insbesondere ist die Verwendung von Aminocoumarin-DEVD als fluorogenes Substrat geeignet.

Markermoleküle, die spezifisch entweder Edukte oder Produkte von Caspasereaktionen binden können, können entweder einen

Farbstoffanteil, ein kolloidales Metall (z.B. Silber, Gold), ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweisen.

Die kumulierte Caspaseaktivität wird insbesondere frühestens 10 h (insbesondere 24 bis 48 h) nach dem Versetzen der Probe mit der mindestens einen Substanz gemessen, da erst dann auch langsam wirkende Zytostatika Apoptose ausgelöst haben. Da Apoptose ein sehr früher Marker für die Wirksamkeit von Zytostatika ist, ist der beschriebene Test deutlich schneller als z.B. der MTT-Test mit 4 Tagen Inkubationsdauer.

Es ist wichtig, die Caspaseaktivität gleicher Zellzahlen nach Apoptose zu vergleichen. Es empfiehlt sich daher, das Ausmaß der Apoptose auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen zu normieren. Dies kann z.B. durch Messung der Lichtabsorption, Streulicht, Leitfähigkeitsmessung oder mikroskopisches Auszählen geschehen. Die Normierung ist notwendig, um das Ausmaß der Zellschädigung durch verschiedene Zytostatika vergleichen zu können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere geeignet zur Stratifizierung von Tumorerkrankungen. Eine Klassifizierung der Tumorerkrankungen wird erfindungsgemäß ermöglicht, aus der sich ergibt, welches bestehende Standardprotokoll für eine Chemotherapie geeignet ist. Der erfindungsgemäße Test erlaubt es relativ schnell festzustellen, ob eine bestimmte Tumorzelllinie auf ein Chemotherapeutikum anspricht. In entsprechender Weise ist die Entwicklung von neuen Protokollen für die Chemotherapie von Tumorerkrankungen möglich, indem das erfindungsgemäße Verfahren zur kumulierten Messung der Caspase-Aktivität als Indikator für das Absterben von Tumorzellen verwendet wird. Schließlich erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren

auch, die Optimierung einer individuellen Chemotherapie gegen Tumorerkrankungen, in dem Patiententumorgewebe mit Chemotherapeutika behandelt werden und deren Ansprechen auf diese Chemotherapeutika durch Apoptose der Tumorzellen erfindungsgemäß bestimmt wird.

Beispiel:

Ein stark wirkendes Zytostatikum, das das Wachstum der Zellen unmittelbar stoppt und alle Zellen in Apoptose überführt, kann aufgrund der geringen Zellzahl deutlich weniger Apoptose aufweisen, als im Falle eines schwächer wirkenden Zytostatikums, bei dem sich die Zellen zunächst noch vermehren können, um dann erst später zu einem geringen Teil in Apoptose zu gehen. Erst die Normierung berücksichtigt die Apoptose in Bezug auf die Gesamtzellzahl und bewertet das stärker wirkende Zytostatikum richtig.

Die Chemosensitivitätstestung von Zellen lässt sich besonders vorteilhaft mit einem Kit durchführen. Dieser Kit beinhaltet einen Probenträger mit mehreren Probenkammern, wobei eine Probenkammer mindestens eine Substanz enthält. Pro Kit ist außerdem eine standardisierte Lösung eines Reagenz zur Messung der Caspase-Aktivität enthalten. Das Caspasesubstrat ist insbesondere Aminocoumarin-DEVD in einem Lysepuffer. Es kann auch ein Caspase-Aktivitäts-Standard, enthalten sein. Bei dem Probenträger kann es sich z.B. um eine handelsübliche Mikrotiterplatte handeln. Die zu testenden Substanzen hängen von der Applikation ab und können vorgefertigt in den Kammern des Probenträgers entweder in Lösung oder eingetrocknet vorliegen. Die Substanzen können dabei entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen wie z.B. Salzen, Puffer, Kohlenhydraten, Carbonsäuren, Pyrimidinen,

anorganischen oder organischen Nanopartikeln bis 1 μm Durchmesser vorliegen.

Fig. 1 zeigt die kumulierte und konventionell gemessene Caspaseaktivität von Jurkat-Zellen, die 4 h mit Actinomycin D induziert wurden.

Fig. 2 zeigt die unterschiedlichen Zeitverläufe der Apoptose in Jurkat- und U937-Zellen nach Induktion durch Actinomycin D.

Figur 3 zeigt die Chemosensitivität von U937-Zellen gegen verschiedene Zytostatika.

Figur 4 zeigt die Chemosensitivität von HL60-Zellen gegen verschiedene Zytostatika.

Figur 5 zeigt die Chemosensitivität von PBMNC gegenüber Daunorubicin.

Figur 6 zeigt die Chemosensitivität von PBMNC gegenüber Ara-C.

Beispiele

Beispiel 1

Die Caspaseaktivitäten von 250000 Jurkat-Zellen in 100 μl Medium wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D konventionell und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der kumulierten Caspaseaktivität bestimmt. Dazu wurden 100 μl Jurkat-Zellen ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) in Gegenwart von Actinomycin D bei 5 % CO_2 und 37°C in RPMI-Medium mit 10 % FCS + Pen-Strep inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen nach konventioneller Methode zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 200 μl

Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und bei -20°C eingefroren. Die kumulierte Caspaseaktivität wurde bestimmt, indem $100\text{ }\mu\text{l}$ der mit Actinomycin D inkubierten Zellen direkt in Suspension mit $100\text{ }\mu\text{l}$ 2x Lysepuffer gemischt werden. Das Lysat wurde ebenfalls bei -20°C eingefroren. Alle Lysate wurden gemeinsam aufgetaut und mit Aminocoumarin-DEVD versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Freisetzung von fluoreszentem Aminocoumarin durch die Caspase alle 5 min. über eine Dauer von 2 h verfolgt. Aus dem linearen Signalanstieg wurde die Steigung als Maß für die Caspaseaktivität berechnet. Die in der Figur nicht gezeigten spontanen Caspase-Aktivitäten der Jurkat-Zellen in Abwesenheit von Actinomycin D nehmen mit der Zeit zu, bleiben aber kleiner als 4 min^{-1} .

Beispiel 2

Die Caspaseaktivität von Jurkat- und U-937-Zellen wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Actinomycin D bestimmt. Dazu wurden je 0.5×10^6 Zellen in 1 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und Pen/Strep zwischen 30 Minuten und 16 Stunden mit $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D auf Zellkulturplatten (48 well) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorf-Cups überführt und zweimal mit Medium gewaschen. Dann wurde das Pellet in Lysepuffer resuspendiert. Nach 10 Minuten auf Eis wurden $50\text{ }\mu\text{M}$ Aminocoumarin-DEVD-Substrat zugegeben und die Caspaseaktivität hier bei 37°C alle 5 min über einen Zeitraum von 2 Stunden verfolgt. Die Fluoreszenz wurde bei 355 nm angeregt und die Emission bei 460 nm gemessen. Aufgetragen ist der zeitliche Anstieg der Fluoreszenzemission gegen die Inkubationszeit mit Actinomycin D.

Beispiel 3

Chemosensitivität von Tumorzell-Linien

Die Chemosensitivitäten von U937- und HL60-Zellen gegen die in den Figuren 3 und 4 bezeichneten Zytostatika wurden in den angegebenen Konzentrationsbereichen getestet. Aus den Figuren wird deutlich, dass die beiden Tumorzell-Linien unterschiedlich stark auf Zytostatika ansprechen, wie es auch im Fall von primären Patientenzellen zu erwarten wäre.

Es wurde die Wirkung von 4 Zytostatika auf die Zell-Linie U937 getestet. Jeder Datenpunkt repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten. Mit steigender Konzentration steigt die Wirksamkeit von Actinomycin D, Daunorubicin und Ara C, während Prednisolon keine oder nur eine geringe Apoptoseinduktion verursacht. Die maximal induzierbare Caspaseaktivität ist bei Ara-C relativ niedrig, während sie bei Daunorubicin deutlich höher und am größten bei Actinomycin D ist.

Zum Vergleich ist die Chemosensitivität von promyeloischen HL60-Zellen in Abb. 2 gezeigt. Auch hier induzieren Actinomycin D und Daunorubicin größere Caspaseaktivitäten, als Ara-C und Prednisolon. Prednisolon zeigt ein Maximum in der Caspaseaktivität bei ca. 700 ng/ml. Bei höheren Konzentrationen sinkt das Apoptosesignal wieder ab. Ara-C scheint bei der höchsten gemessenen Konzentration noch nicht die maximal durch dieses Zytostatikum induzierbare Caspaseaktivität erreicht zu haben.

Beispiel 4

Chemosensitivität von PBMNC

Zur Etablierung des Tests für peripheres Blut bzw. Knochenmark wurde zuerst isolierte Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) von freiwilligen, gesunden Probanden getestet, wobei Wert darauf gelegt wurde, dass eine akute Infektion, wie sie in den Herbst-/Wintermonaten verstärkt auftritt, ausgeschlossen werden konnte. Die Figuren 5 und 6 stellen die Ergebnisse der Untersuchungen mit zwei Zytostatika dar.

In Figur 5 ist die Wirkung von Daunorubicin auf die mononukleären Zellen von acht Probanden (NP) zu sehen, wobei jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt ist. Eine Caspaseaktivität ist durch >50 ng/ml Daunorubicin induzierbar, ein Plateau, d.h. eine auf dem Maximum gleichbleibende Caspaseaktivität wird jedoch bei den Personen NP1 und NP5 bis NP8 nicht und bei den Personen NP2 bis NP4 nur ansatzweise erreicht. Im Vergleich zu getesteten Leukämie-Zelllinien, reagieren die PBMNC später auf Daunorubicin.

Figur 6 zeigt die Wirkung von Ara-C auf die mononukleären Zellen der Probanden NP5 bis NP8; dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Eine Caspaseaktivität ist durch >200 ng/ml Ara-C induzierbar, ein Plateau, d.h. eine auf dem Maximum gleichbleibende Caspaseaktivität wird jedoch bei keinen der getesteten PBMNC erreicht.

Im Vergleich zu den Daten der Zelllinien HL60 und U937 (Beispiel 3) wird erkennbar, dass die maximal induzierbare Caspaseaktivität bei den zwei Zelllinien niedriger ist.

Ansprüche

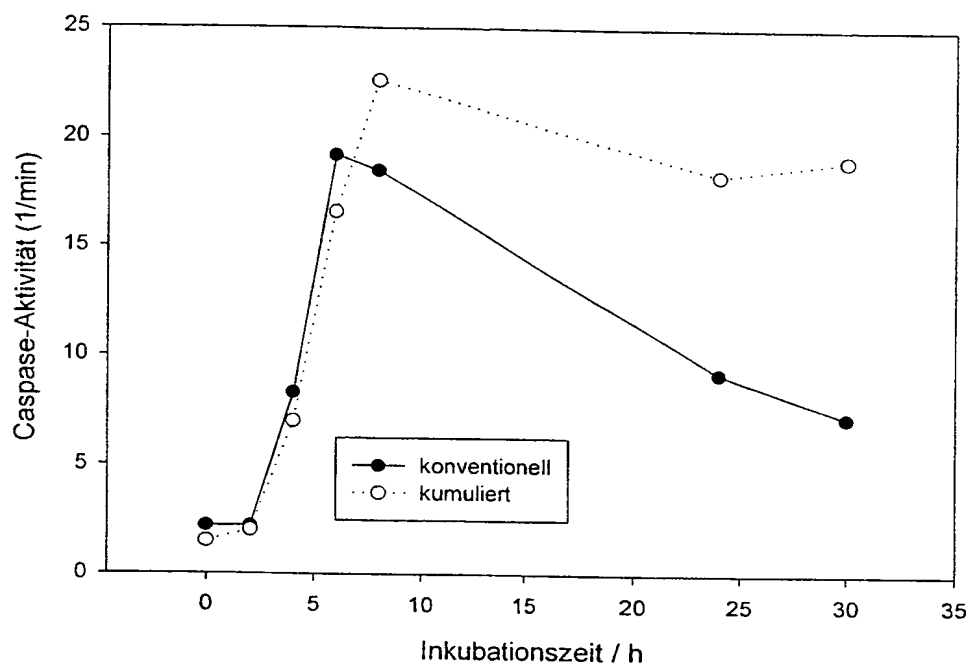
1. Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Apoptose durch kumulierte Caspase-Aktivität in einer Probe mit Zellen und einem Medium bestimmt wird, indem die Probe mit der mindestens einen Substanz versetzt und inkubiert wird und nach Zerstörung der Zellen ohne vorherige Abtrennung der Zellen die kumulierte Caspase-Aktivität in der Probe gemessen wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Zellen tierische oder humane Zellen sind, insbesondere Leukämiezellen, Zellen solider Tumore, Zellen pathologischer Organe und/oder Referenzzellen wie beispielsweise Zellen aus anderen als den pathologischen Organen oder Zellen aus gesunden Bereichen pathologischer Organe.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Substanzen pharmazeutische Wirksubstanzen, Chemotherapeutika, Umweltschadstoffe, Peptide, Nukleinsäuren oder Derivate hiervon, PNAs und/oder Nukleinsäurehybride eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Caspase-Aktivität durch Substratumsatz von fluorogenen oder chromogenen Substraten oder durch Bindung von spezifischen Markern wie Antikörpern, F_{ab}-Fragmenten, single chain Antikörpern, Aptameren (Strukturen bindende Nukleinsäuren)

und/oder sonstige Proteinen mit Bindungsstellen für entweder unveränderte (Edukte) oder umgesetzte Caspase-Substrate (Produkte) gemessen wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker einen Farbstoffanteil, ein kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die kumulierte Caspase-Aktivität frühestens 10 h, insbesondere 24 bis 48 h nach dem Versetzen der Probe mit der mindestens einen Substanz gemessen wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die gemessene Caspase-Aktivität auf die Gesamtzellzahl normiert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Messung der Caspase-Aktivität zur Stratifizierung von Tumorerkrankungen, zur Entwicklung von neuen Chemotherapien von Tumorerkrankungen und/oder Optimierung einer individuellen Chemotherapie gegen Tumorerkrankungen eingesetzt wird.
9. Kit enthaltend einen Probenträger mit Probenkammern, wobei die Probenkammern mindestens eine Substanz enthalten sowie eine standardisierte Lösung eines Reagenz zur Messung der Caspase-Aktivität.

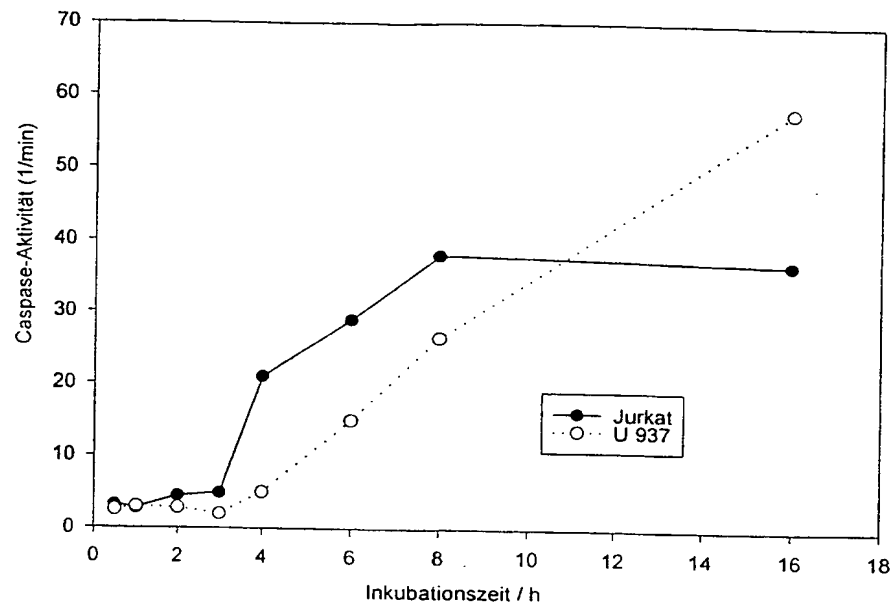
10. Kit nach Anspruch 9, wobei die Substanzen als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen vorliegen.
11. Kit nach einem der Ansprüche 9 und/oder 10, wobei die Matrixsubstanzen Salze, Puffer, Kohlenhydrate, Carbonsäuren, Pyrimidine, anorganische oder organische Nanopartikel bis 1 μm Durchmesser sein können.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figur 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figur 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

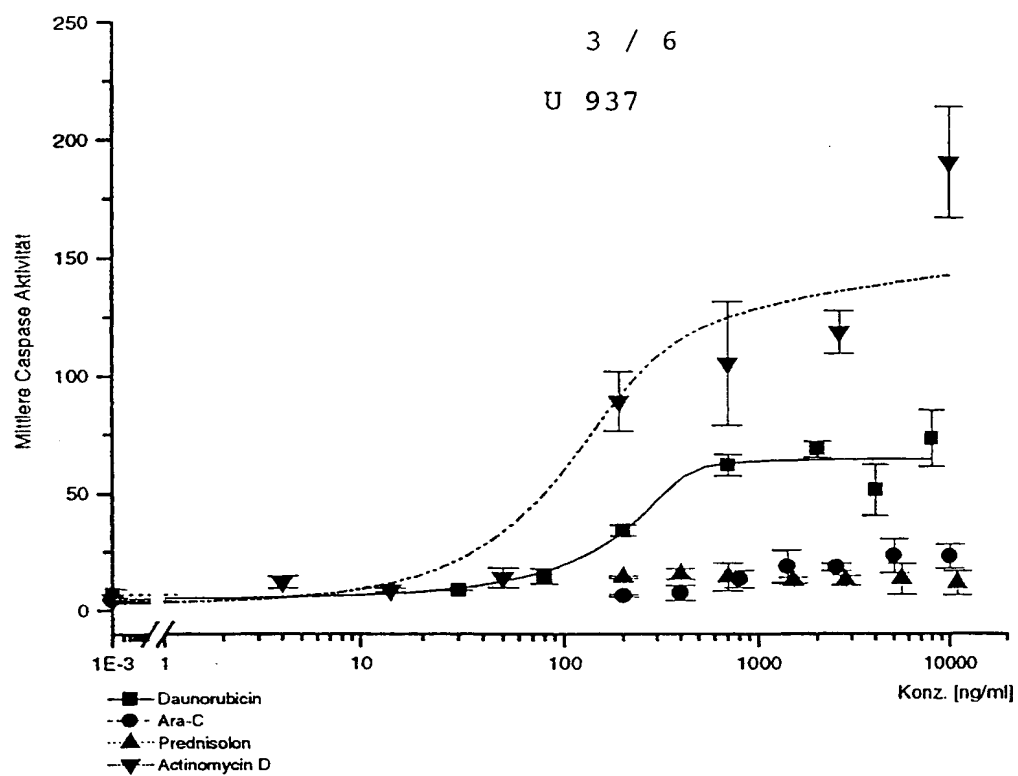


Fig. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

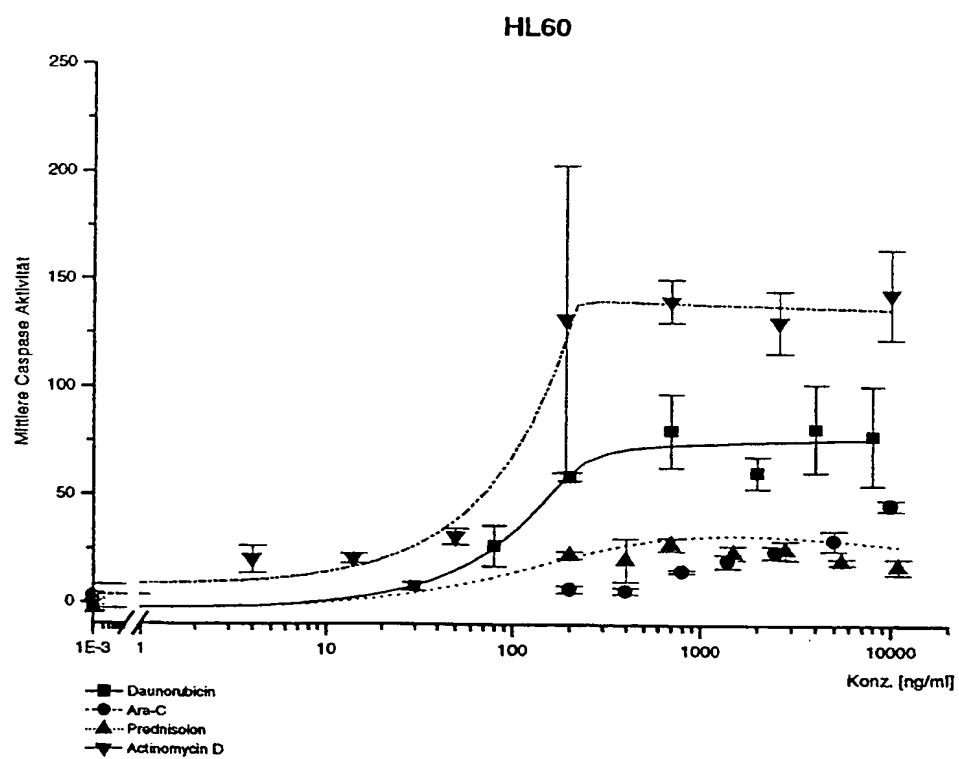


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

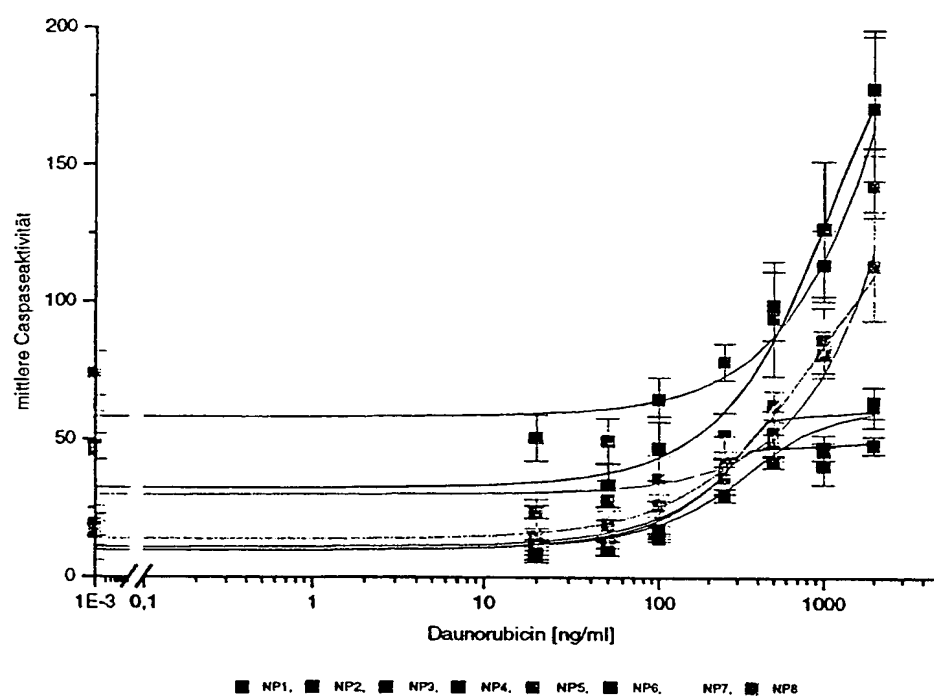


Fig. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

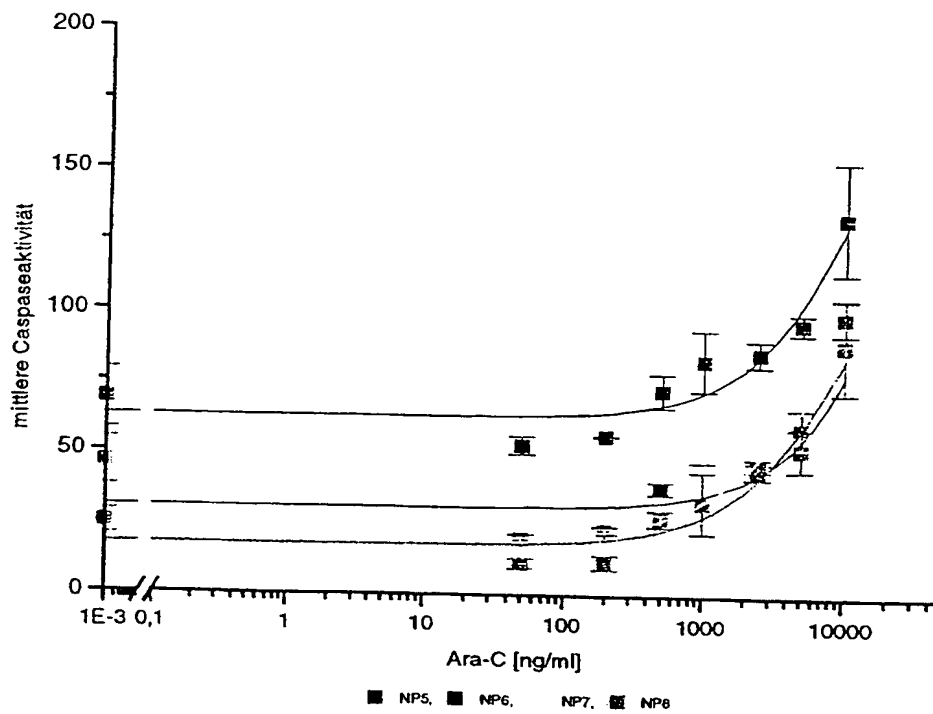


Fig. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Av	K	Sg	W	Da	Hi	HP	ME	TW	JH	KB
25 JUL 2000										
K	F12.10.00 129.00 PCT									

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 12 July 2000 (12.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 000745woMege	
International application No. PCT/EP00/02174	International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)
Applicant EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
12 Marc 1999 (12.03.99)	199 10 956.7	DE	20 June 2000 (20.06.00)✓
30 Apri 1999 (30.04.99)	99108495.5	EP	20 June 2000 (20.06.00)✓

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Aino Metcalfe

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

AVK Scl W La Hi HPJ MZ TW JH KB

22 SEP 2000

K F 12.03.00/12.07.00 16d

Date of mailing (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 000745woMege			
International application No. PCT/EP00/02174	International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)	
Applicant EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 14 September 2000 (14.09.00) under No. WO 00/54049

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

Av	K	Sg	W	Da	Hi	HP	ME	TW	JH	KP
10. JUL 2000										
K F 12.10.00/12.09.00										

Date of mailing (day/month/year) 27 June 2000 (27.06.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 000745woMege	International application No. PCT/EP00/02174

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH (for all designated States except US)
MEYER-ALMES, Franz, Josef (for US)

International filing date : 13 March 2000 (13.03.00) —
Priority date(s) claimed : 12 March 1999 (12.03.99) —
30 April 1999 (30.04.99) —
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 15 May 2000 (15.05.00)
List of designated Offices :

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National : JP,US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Peggy Steunenbergh
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is **the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)